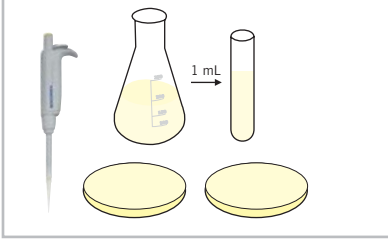


Ek A - 01

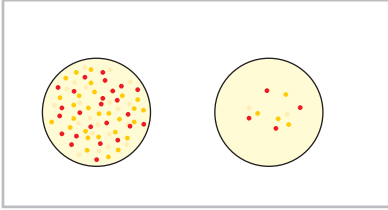
Toplam Mezofil Aerob Bakteri Sayımı



10 g (mL) gıda, 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Gerekli seyreltmeler yapılır. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir. PCA (Merck 1.05463) besiyerine ekim yapılır.



Petri kutuları amaca göre 28 °C ya da 37 °C'da 48 saat inkübasyona bırakılır.




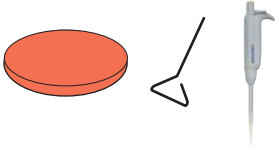



İnkübasyon sonunda besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılır, gıdadaki toplam mezofil aerob bakteri sayısı hesaplanır.



Petri kutuları otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

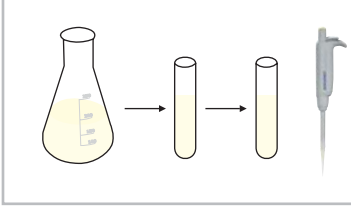
Ek A - 02

Koliform Bakterilerin Sayılması; Katı Besiyeri (ISO 4832)

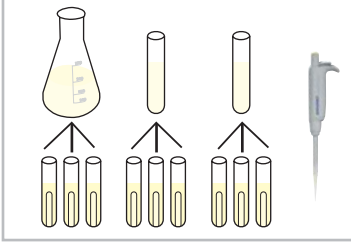
	<p>10 g (mL) gıda, 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.</p>
	<p>VRB Agar (Merck 1.01406) besiyerine ekim yapıp, ikinci kat VRB ilave edilir.</p>
	<p>Petri kutuları 30-32 °C ya da 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.</p>
	<p>1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili koyu kırmızı koloniler sayılır.</p>
	<p>Sterilizasyondan sonra petri kutuları yıkanır/atılır.</p>

Ek A - 03

Koliform Bakterilerin Sayılması; EMS Yöntemi (ISO 7725)



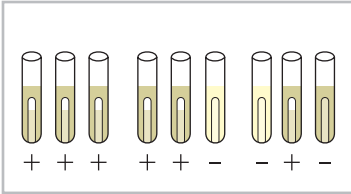
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. 10^{-2} ve katı gıdalarda 10^{-3} seyreltiler hazırlanır.



İçlerinde Durham tüpü bulunan LST Broth (Merck 1.10266) besiyerinden; katı gıdalarda 10^{-1} ; 10^{-2} ve 10^{-3} , sıvı gıdalardan 10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden olmak üzere 3'er tüpe 1'er mL ekim yapılır.



Tüpler 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirilir. EMS tablosu kullanılarak gıdadaki koliform grup bakteri sayısı hesaplanır.

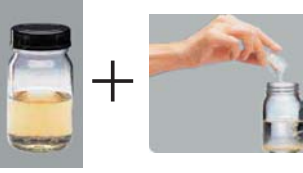


Sterilizasyondan sonra tüpler yıkanır.

100 mL Suda Koliform Bakteri ve E.coli Aranması



100 mL su örneği steril bir kaba alınır.



Üzerine 1 poşet Readycult Coliforms (Merck 1.01298) ilave edilir.



Çalkalanıp, 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Besiyeri renginin yeşile dönüşmesi koliform pozitif olarak değerlendirilir.



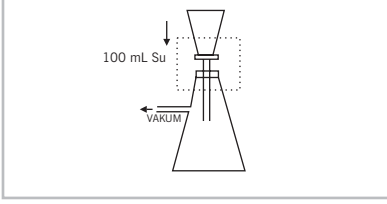
Koliform pozitif olan örnek, loş bir yerde kısa dalga boylu UV lambası (Merck 1.13203) ile incelenir. Bunlardan floresan ışımaya verenler *E. coli* olarak değerlendirilir.



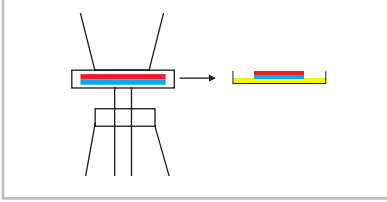
Sterilizasyondan sonra kullanılmış malzeme yıkanır.

Ek A - 05

Membran Filtrasyon Yöntemiyle Sularda Koliform Bakteri Aranması



100 mL su, membran filtrasyon sisteminden geçirilir, filtre Lactose TTC Agar with Tergitol 7 (Merck 1.07680) üzerine yerleştirilir.



Filtrenin, bakterilerin tutulmuş olduğu üst kısmı Petri kutusuna yerleştirmede yine yukarıda olmalıdır.

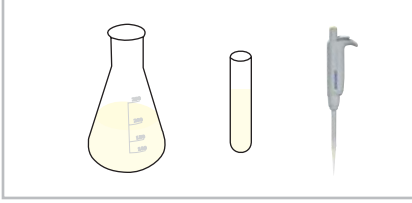


Petri kutusu tabanı üzerinde olacak şekilde 30-32 °C ya da 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Sarı-portakal renkli koloniler koliform grup bakteri olarak değerlendirilir ve su örneğindeki koliform grup bakteri sayısı hesaplanır.

***E. coli* Sayılması; Katı Besiyeri**



10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. Sıvı gıdalar doğrudan analize alınabilir.



Fluorocult VRB Agar'a (Merck 1.01406) ya da Chromocult Coliform Agar'a (Merck 1.10426) ya da Chromocult TBX Agar'a (Merck 1.16122) ekim yapılır. VRB Agar ekiminde ikinci kat VRB Agar ilave edilir.



Her ikisi de 35-37 °C'da olmak üzere Fluorocult VRB Agar 18 saat ve Chromocult Coliform Agar 24 saat inkübasyona bırakılır. Chromocult TBX Agar ise 44 °C'da 18-24 saat inkübe edilir.

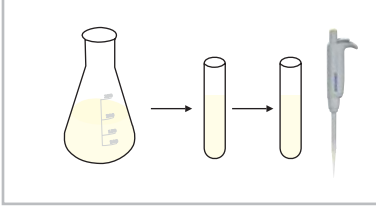


Fluorocult VRB Agar'da 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili koyu kırmızı ve kısa dalga boylu UV lamba (Merck 1.13203) ile loş bir yerde floresan veren koloniler, Chromocult Coliform Agar'da 1-2 mm çaplı mavi-menekşe koloniler, Chromocult TBX Agar'da mavi-yeşil koloniler sayılır ve gıdadaki *E. coli* sayısı hesaplanır.

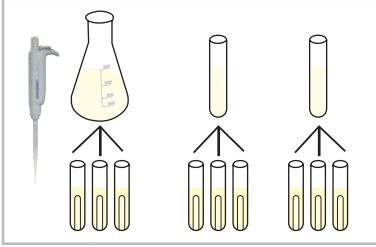


Sterilizasyondan sonra petri kutuları yıkanır/atılır.

***E. coli* Sayılması; Hızlı EMS Yöntemi**



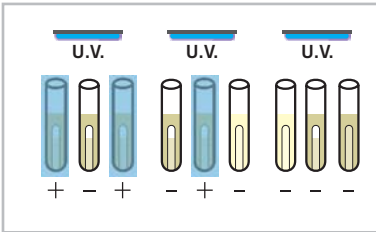
10 g (mL), gıda 90 mL MRD (Merck 1.12535) ile homojenize edilir. 10^{-2} ve katı gıdalarda 10^{-3} seyreltiler hazırlanır.



İçlerinde Durham tüpü bulunan Fluorocult LST Broth (Merck 1.12588) besiyerinden; katı gıdalarda 10^{-1} ; 10^{-2} ve 10^{-3} , sıvı gıdalardan 10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden olmak üzere 3'er tüpe 1'er mL ekim yapılır.



Tüpler 35-37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Bulanıklık ve Durham tüplerinde gaz oluşumu görülen koliform pozitif tüpler loş bir yerde kısa dalga boyulu UV lambası (Merck 1.13203) ile incelenir. Bunlardan floresan ışığa verenler *E. coli* olarak değerlendirilir (bakınız; ek ABC). Floresan ışımadan emin olunmazsa tüplere 1 mL 1 N NaOH eklenip tekrar incelenir. EMS tablosu kullanılarak gıdadaki *E. coli* sayısı hesaplanır.




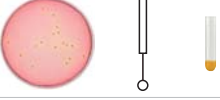







Sterilizasyondan sonra tüpler yıkanır.

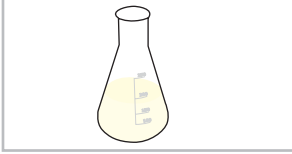
Singlepath® E.coli O157 Test Kiti Uygulama Şeması

	<p>▶ 25 g (mL) gıda 225 mL selektif zenginleştirme besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.</p>
	<p>▶ İnkübasyon: 35–37 °C'da 18–24 saat</p>
	<p>▶ Selektif zenginleştirme kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.</p>
	<p>▶ Oda sıcaklığına getirilir.</p>
	<p>▶ Singlepath E. coli O157 kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.</p>
	<p>▶ 20 dakika beklenir</p>
	<p>▶ Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>E. coli</i> O157 pozitif, olmazsa <i>E. coli</i> O157 negatif olarak değerlendirilir.</p>
	<p>▶ Toplam analiz süresi 21 saat 35 dakika</p>
	<p>▶ Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.</p>

Singlepath® Verotoxins Test Kiti Uygulama Şeması

	▶ 25 g gıda 225 mL mTSB ya da mEC Broth besiyerine ilave edilir. Süt ürünleri için mTSB Broth, et ürünleri için mEC Broth kullanılmalıdır. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	▶ mEC Broth 42°C 'da, mTSB Broth 35–37 °C'da 18–24 saat inkübe edilir.
	▶ Selektif zenginleştirme kültüründen CT–SMAC Agar besiyerine tek koloniler düşecek şekilde sürme ya da yayma yapılır.
	▶ CT–SMAC Agar 35–37 °C'da 18–24 saat inkübe edilir.
	▶ CT–SMAC Agar besiyerinden tipik birkaç koloni 1 mL Caye Broth + Carbox besiyerine inoküle edilir.
	▶ 37 °C'da 6 saat inkübe edilir.
	▶ Bu kültürden Eppendorf tüpüne 180 µL alınır, üzerine 20 µL polimiksin çözeltisi ilave edilir.
	▶ 35–37 °C 'da 10 dakika inkübe edilir.
	▶ Duopath Verotoxins kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	▶ 20 dakika beklenir.
	▶ Kite (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (VT1) ve/veya (VT2) şeridi kırmızı olursa bu verotoksin(ler) açısından pozitif, olmazsa negatif olarak değerlendirilir.
	▶ Toplam analiz süresi 48 saat 35 dakika.
	▶ Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

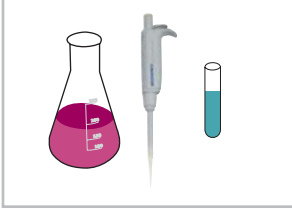
Salmonella Aranması (ISO 6579)



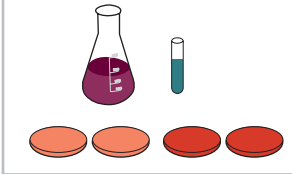
25 g (mL) gıda, 225 mL TPS (Merck 1.07228) ile homojenize edilir.



Homojenizat 35-37 °C'da 16-20 saat inkübasyona bırakılır.



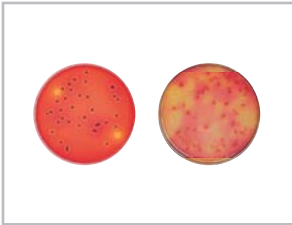
İnkübasyondan sonra Selenit Sistin (Merck 1.07709) ve RVS Broth (Merck 1.07700) selektif zenginleştirme besiyerlerine ekim yapılır. Selektif zenginleştirmede 10 mL RVS Broth'a ön zenginleştirme kültüründen 0,1 mL eklenir ve inkübasyon 42-43 °C'da 24 saat olarak yapılır. SS Broth kullanımında ise 100 mL besiyerine 10 mL ön zenginleştirme kültürü ilave edilir ve 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Her 2 selektif zenginleştirme kültüründen ayrı ayrı olmak üzere Brilliant Green Fenol Red (BGFR; Merck 1.10747) Agar ile laboratuvarın tercihine bırakılan başka bir selektif katı besiyerine sürme yapılır. Rambach Agar (Merck 1.07500), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck 1.05287) ve özellikle XLT 4 Agar (Merck 1.13919 ve Merck 1.08981) önerilmektedir.



Petri kutuları 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılır.



Tipik koloniler varsa bunlardan 5 adedi ayrı ayrı olmak üzere Triple Sugar Iron (TSI) Agar (Merck 1.03915), Urea Broth (Merck 1.08483) ve Lysine Iron Agar (Merck 1.11640) besiyerinde tanımlanır. *Salmonella* için tipik koloniler; BGFR Agar'da etrafı parlak kırmızı bir zon ile çevrili, pembe kırmızı renkli, XLD Agar'da besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli, XLT4 Agar'da siyah renkli ve Rambach Agar'da kırmızı renklidir. Singlepath Salmonella da kullanılabilir (bakınız; ek ABC).

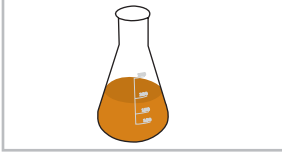


Çalışmada kullanılan bütün malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

Singlepath® Salmonella Test Kiti Uygulama Şeması

	▶ 25 g (mL) gıda 225 mL TPS (Merk 1.07228) besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon
	▶ inkübasyon: 37 °C 'da 18±2 saat
	▶ TPS kültüründen 0,1 mL alınıp 10 mL RVS Broth besiyerine aktarılır.
	▶ inkübasyon: 41,5 °C'da 24±3 saat
	▶ RVS kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	▶ Oda sıcaklığına getirilir.
	▶ Singlepath Salmonella kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	▶ 20 dakika beklenir.
	▶ Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>Salmonella</i> pozitif, olmazsa <i>Salmonella</i> negatif olarak değerlendirilir.
	▶ Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika.
	▶ Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

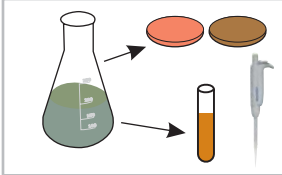
Listeria Aranması (ISO 11290)



25 g (mL) gıda, 225 mL 1/2 Fraser Broth (Merck 1.10398 ve Merck 1.10399) ile homojenize edilir.



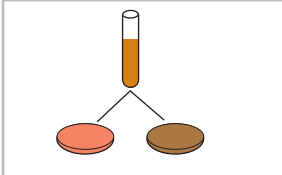
Homojenizat 30 °C'da 24 saat inkübe edilir. Gıdadaki Listeria'nın hasar görmüş olduğu düşünülüyorsa selektif katkısı ilave edilmemiş Fraser Broth besiyerinde homojenize edilip, 30 °C'da 4 saat kendi halinde bırakılır. Daha sonra selektif katkı ilave edilip aynı sıcaklıkta 20 saat daha inkübe edilir.



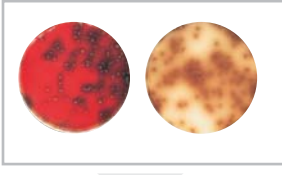
Bu sürenin sonunda 10 mL tam Fraser Broth besiyerine 0,1 mL inoküle edilir, paralel olarak PALCAM Agar (Merck 1.11755 ve Merck 1.12122) ile Oxford Agar (Merck 1.07004 ve Merck 1.07006) besiyerlerine öze ile sürme yapılır.



Tam kuvvette Fraser Broth 35-37 °C'da 48 saat, PALCAM ve Oxford Agar 35-37 °C'da 24 saat inkübe edilir.



Tam kuvvette Fraser Broth besiyerinden 24 ve 48 saatlerde aynı besiyerlerine sürme yapılır. 1/2 Fraser Broth besiyerinden yapılmış ilk Petri kutuları değerlendirilir.



Listeria için tipik koloniler; PALCAM Agar'da 1,5-2 mm çapında, zeytin yeşili gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu, Oxford Agar'da ise 2-3 mm çapında, siyahımsı yeşil kahverengi, siyah zonlu, çökük merkezlidir. Tipik kolonilere hemoliz, CAMP testi, ramnoz ve ksiloz testleri yapılır, Singlepath Listeria da kullanılabilir (bakınız; ek ABC).



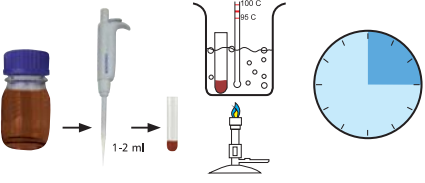
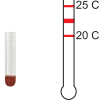
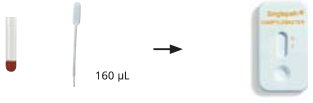






Kullanılmış tüm malzeme otoklavlandıktan sonra yıkanır/atılır.

Singlepath® *Listeria* Test Kiti Uygulama Şeması

	▶ 25 g (mL) gıda 225 mL yarı seçtif zenginleştirme besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	▶ İnkübasyon: 28–30 °C'da 18–24 saat
	▶ Yarı seçtif zenginleştirme kültüründen 0,1 mL alınıp 9,9 mL seçtif zenginleştirme besiyerine aktarılır.
	▶ İnkübasyon: 28–30 °C'da 18–24 saat
	▶ Seçtif zenginleştirme kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni önce uygun bir sıvı besiyerinde 28–30 °C 'da 18–24 saat inkübe edilir ve buradan alınan 1–2 mL kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	▶ Oda sıcaklığına getirilir.
	▶ Singlepath <i>Listeria</i> kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	▶ 20 dakika beklenir.
	▶ Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>Listeria</i> pozitif, olmazsa <i>Listeria</i> negatif olarak değerlendirilir.
	▶ Toplam analiz süresi 42 saat 35 dakika.
	▶ Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.

Singlepath® *Campylobacter* Test Kiti Uygulama Şeması

	25 g gıda 225 mL ya da 25 mL gıda 200 mL Bolton Broth (Merck 1.00068 ve Merk 1.00069) besiyerine ilave edilir. Gerekirse homojenizasyon yapılır.
	İnkübasyon: 37 °C 'da 4 saat ve ilaveten 41,5 °C 'da 44 saat.
	Selektif zenginleştirme kültüründen 1–2 mL alınıp, kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur. Her hangi bir katı besiyerinden izole edilen koloni katı besiyeri parçalarının gelmemesine dikkat edilerek 1–2 mL saf suda çözülür ve kaynar su banyosunda 15 dakika tutulur.
	Oda sıcaklığına getirilir.
	Singlepath <i>Campylobacter</i> kitine 160 µL (Pastör pipeti ile 5 damla) ilave edilir. Kit daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.
	20 dakika beklenir
	Kitte (C) şeridi kırmızı olmalıdır. (T) şeridi kırmızı olursa <i>Campylobacter</i> pozitif, olmazsa <i>Campylobacter</i> negatif olarak değerlendirilir.
	Toplam analiz süresi 48 saat 35 dakika.
	Kullanılan tüm malzeme otoklavlandıktan ya da dezenfektana bırakıldıktan sonra yıkanır/ atılır.